

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2001-503730  
(P2001-503730A)

(43)公表日 平成13年3月21日(2001.3.21)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 0 7 H 21/00		C 0 7 H 21/00	
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 27/447		C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平9-533034  
(86)(22)出願日 平成9年3月14日(1997.3.14)  
(85)翻訳文提出日 平成10年9月10日(1998.9.10)  
(86)国際出願番号 PCT/DE97/00517  
(87)国際公開番号 WO97/34908  
(87)国際公開日 平成9年9月25日(1997.9.25)  
(31)優先権主張番号 19610354.1  
(32)優先日 平成8年3月15日(1996.3.15)  
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP, US

(71)出願人 ビラテック・ゲゼルシャフト・ツール・エントピックルング・バイオテクノロジー・ジステーメ・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング  
ドイツ連邦共和国、07407 ルードルシュタット、プロフェッソル・ヘルマン・クラレ・シュトラッセ、6  
(72)発明者 ランゲ, ハンス  
ドイツ連邦共和国、デー-68623 ラムベルトハイム、ローマシュトラッセ、99・デー  
(74)代理人 弁理士 深見 久郎 (外3名)

(54)【発明の名称】 核酸を分離するための方法および装置

(57)【要約】

この発明は、核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から核酸を分離するための装置に関する。この装置では、吸着材(100)を収容する反応室(17)が取出し室(50)に接続され、電気泳動装置(20a, 20b)によって、核酸を反応室(17)から取出し室(50)に移動させて濃縮させることができる。

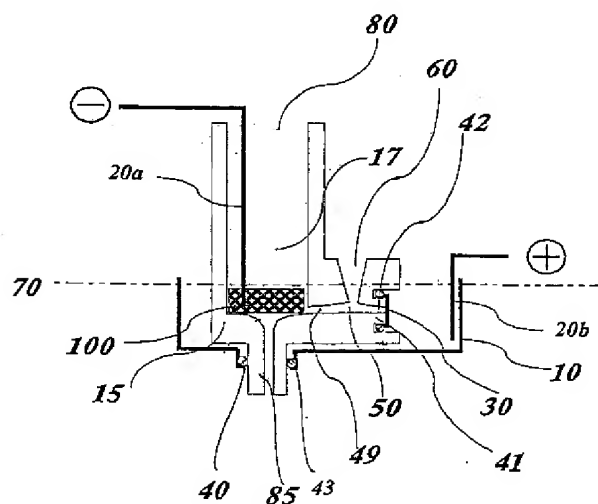


Fig. 1

**【特許請求の範囲】**

1. 核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から核酸を分離するための方法であって、
  - a) 前記核酸を吸着媒体（100）に結合させ、
  - b) 前記吸着媒体（100）から前記核酸を溶出させ、
  - c) 電気泳動によって反応室（17）からそこに接続された取出し室（50）に前記核酸を移動させかつ前記取出し室で濃縮する、方法。
2. 前記吸着媒体（100）が前記吸着の後に洗浄されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。
3. 緩衝液の変更または電気泳動によって前記核酸が前記吸着媒体（100）から溶出されることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。
4. 前記取出し室（50）に存在する溶出容積が、元の試料の容積よりも小さいことを特徴とする、請求項1から3のいずれかに記載の方法。
5. 前記核酸が、前記吸着の前に溶解によって放出されることを特徴とする、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. 生物学的流体または懸濁液が、液化によって固体材料から調製されることを特徴とする、請求項1から5のいずれかに記載の方法。
7. 前記吸着媒体（100）が、シリカゲル、ガラス粒子、ガラス繊維のフリースまたはイオン交換材料からなることを特徴とする、請求項1から6のいずれかに記載の方法。
8. 前記吸着媒体（100）が、ガラスによりコーティングされた磁性粒子からなり、前記磁性粒子に吸着した前記核酸が磁石（312）によって分離されることを特徴とする、請求項1から7のいずれかに記載の方法。
9. 前記溶出の後にハイブリダイゼーションが行なわれることを特徴とする、請求項1から8のいずれかに記載の方法。
10. 前記溶出の後に増幅が行なわれることを特徴とする、請求項1から9のいずれかに記載の方法。
11. 前記溶出の後に化学ルミネセンス検出が行なわれることを特徴とする、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

12. 核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から核酸を分離するための装置であって、前記核酸が積載される吸着媒体(100)を保持するための反応室(17)が取出し室(50)に接続され、前記核酸を、電気泳動デバイス(20a, 20b)によって前記反応室(17)から前記取出し室(50)に移動させることができかつ前記取出し室で濃縮することができることを特徴とする、装置。

13. 前記反応室(17)が、電気泳動緩衝液タンク(10)によって囲まれることを特徴とする、請求項12に記載の装置。

14. 前記反応室(17)が、イオン伝導性の態様で前記電気泳動緩衝液タンク(10)に接続されることを特徴とする、請求項13に記載の装置。

15. 前記反応室(17)が、前記電気泳動緩衝液タンク(10)に置かれることを特徴とする、請求項13または14に記載の装置。

16. 前記反応室(17)が、少なくとも1つのオリフィス(80)を介して充填および排出され得ることを特徴とする、請求項12から15のいずれかに記載の装置。

17. 核酸のための吸着媒体(100)が、前記反応室(17)に保持されることを特徴とする、請求項12から16のいずれかに記載の装置。

18. 前記イオン伝導性の接続部が、核酸を保持する少なくとも1つの浸透膜(31)によって形成されることを特徴とする、請求項12から17のいずれかに記載の装置。

19. 前記装置が熱可塑性材料から作られることを特徴とする、請求項12から18のいずれかに記載の装置。

20. 前記電気泳動デバイスが少なくとも2つの電極(20a, 20b)を有し、前記少なくとも2つの電極のうちの少なくとも1つは前記電気泳動緩衝液タンク(10)の中に突出するか、またはその構成要素であることを特徴とする、請求項12から19のいずれかに記載の装置。

21. 前記電気泳動デバイスが少なくとも2つの電極(20a, 20b)を有し、前記少なくとも2つの電極のうちの少なくとも1つは前記取出し室(50)の中に突出するか、前記取出し室(50)を囲む容器(15)の構成要素であることを特徴とする、請求項12から19のいずれかに記載の装置。

22. 前記電極(20a, 20b)のうちの1つが前記反応室(17)内に突出するか、前記反応室(17)を囲む前記容器(15)の構成要素であることを特徴とする、請求項20または21に記載の装置。

23. 前記電極(20a, 20b)のうちの少なくとも1つが、導電性プラスチックから作られることを特徴とする、請求項20から22のいずれかに記載の装置。

24. 前記導電性プラスチックが、グラファイト、鉄、銀または他の金属などの導電性添加物を含むことを特徴とする、請求項23に記載の装置。

25. 前記電極(20a, 20b)の抵抗が100MΩ未満であることを特徴とする、請求項20から24のいずれかに記載の装置。

26. 前記電極(20a, 20b)がコーティングを有することを特徴とする、請求項20から25のいずれかに記載の装置。

27. 前記コーティングが複数の層(323, 324, 325)からなることを特徴とする、請求項26に記載の装置。

28. 少なくとも1つの前記層(323, 324, 325)が、好ましくは結合可能なタンパク質である生体高分子から形成されることを特徴とする、請求項27に記載の装置。

29. 前記結合可能なタンパク質が、抗体、抗原または他のリガンドーレセプター対の構成要素であることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

30. 前記生体高分子が、核酸がそれに結合し得るタイプのものであることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

31. 前記生体高分子がオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

32. 前記生体高分子がタンパク質様アミノ酸構造物(PNA構造物)であることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

33. 前記層(323, 324, 325)のうちの1つが、化学反応性のリンカー分子からなることを特徴とする、請求項27に記載の装置。

34. 前記容器(15)の壁に2つの電極(20a, 20b)が互いに対向して設けられることを特徴とする、請求項20または21に記載の装置。

35. オンおよびオフに切換えることができる、磁界を発生するための手段(312)が、前記磁界が前記容器(15)を透過できるような態様で配置されることを特徴とする、請求項12から34のいずれかに記載の装置。

36. 好ましくは光電子増倍管(314)である検出装置が前記容器(15)の付近に配置されることを特徴とする、請求項12から35のいずれかに記載の装置。

37. 前記容器(15)が光学窓(316)を有することを特徴とする、請求項36に記載の装置。

38. 前記装置に割り当てられた前記電極(20a, 20b)が、互いに電氣的に接続されかつ電源(220)に接続されることを特徴とする、請求項12から37のいずれかに記載の複数の装置を有する溶出装置。

39. 前記装置が、96ウェルマイクロ滴定プレートの形式で幾何学的に配置されることを特徴とする、請求項38に記載の溶出装置。

40. x, y, z方向にピペッティングするアーム(190)、

サーモスタットが付けられた振とう機フレーム(170)、

周期的な加熱および冷却のための加熱/冷却媒体(329)、

電源(220)、

少なくとも2つの電極(20a, 20b)、

少なくとも1つのポンプ(120, 130)、

少なくとも1つの磁石(312)、および

少なくとも1つの光電子増倍管(314)のデバイスのうちの少なくとも1つが設けられていることを特徴とする、請求項12から37のいずれかに記載の装置または請求項38または39に記載の溶出装置を有する、精製および濃縮装置。

41. 前記装置、前記溶出装置および単数または複数の前記デバイスが、請求項1から11のいずれかに記載の方法を行なうための処理コンピュータによって自動的に制御され得ることを特徴とする、請求項40に記載の精製および濃縮装置。

**【発明の詳細な説明】****核酸を分離するための方法および装置**

この発明は、核酸を分離するための方法および装置に関する。

細胞から得られた核酸をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって分析する前には、核酸を精製して濃縮することが必要である。また、ヘモグロビン補欠分子族などの、ポリメラーゼ連鎖反応を妨害するいくつかの物質を、分析試料から除去することが必要であろう。

さらに、たとえばハイブリダイゼーションのような、核酸分析のための他の技術においては、分析される核酸の精製および濃縮もまた重要な役割を果たす。

“Methods of Enzymology” 第68巻170頁から182頁には、核酸を分離するために「スピナーカラム」を用いることが開示されている。DE 4139664 A1によって開示されているこの技術の変形例では、以下の作業工程が用いられている。

a a) 細胞の分解

b b) 高イオン強度の緩衝液の存在下で、ガラス繊維フリースへの核酸の吸着

c c) 低イオン強度の緩衝液による、核酸の溶出

工程a a) で、核酸が吸着するガラス繊維フリースに液体の試料を通す。次に、ガラス繊維フリースを種々の溶液で洗浄する。最後に、低イオン強度の緩衝液の存在下で固相から核酸を溶出する。

公知のプロセスは多くの点において不利である。すなわち、固相の洗浄時に試料が汚染するおそれがある。さらに、ガラス繊維フリース内には大きな毛管力があるため、フリースから核酸を部分的にしか回収することができない。

さらに、“Methods in Enzymology 65”（1980）の371頁から380頁にはゲル電気泳動法が開示されており、この方法では核酸がゲルに結合し、その後電氣的溶離によって溶液の中に戻される。この場合にもまた、溶液の汚染が起こるおそれがある。核酸は高希釈度で溶液中に存在する。濃縮は起こらない。

この発明の目的は、先行技術の欠点を回避する方法および装置を特定することである。特に、簡単にかつあまり費用を掛けずに核酸を精製および濃縮すること

を可能にする、核酸を分離するための方法および装置を特定する。さらに、実質的に自動化された核酸の分離および濃縮を行なえるようにする。最後に、この発明の目的は汚染を回避することである。

この目的は請求項1および12の特徴によって達成される。方法または装置を好都合に発展させたものが請求項2から11および13から41の特徴によってそれぞれ与えられる。

この発明により、核酸を含有する生物学的流体（液体）および懸濁液から核酸を分離するための方法が提供され、

- a) 該核酸は吸着媒体に結合され、
- b) 該核酸は吸着媒体から溶出され、
- c) 電気泳動によって、反応室から、反応室に接続された取出し室の中に移動され、そこで濃縮される。

この方法は、簡単な態様で液体から核酸を精製および濃縮することを可能にする。特に自動的な処理法において、汚染のリスクを大幅になくすることができる。溶出は、緩衝液の変更によるか、または電氣的溶離または電気泳動によって電氣的に行なうことができる。

さらに、この発明により、核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から核酸を分離するための装置が提供され、核酸を積載した吸着媒体を収容するための反応室は取出し室に接続され、核酸は電気泳動装置によって反応室から取出し室まで移動させることができ、そこで濃縮できる。この装置は、核酸の簡単で費用がかからない濃縮および分離を可能にする。別個の取出し室を設けることにより、汚染の問題を大幅になくすることができる。

発明の例示的な具体例は図面を参照して以下により詳細に説明される。図面において、

図1は、装置の第1の例示的な具体例を示す概略断面図であり、

図2は、「スピンカラム」を備えた、図1に従う例示的な具体例を示す図であり、

図3は、装置の第2の例示的な具体例を示す概略断面図であり、

図4は、図3に示される装置を有する精製および濃縮装置の第1の例示的な具

体例に沿った概略断面図であり、

図5は、平床式アガロースゲルを示す平面図であり、

図6 aは、装置の第3の例示的な具体例を示す概略断面図であり、

図6 bは、図6 aに示される例示的な具体例の部分変形例を示す図であり、

図6 cは、装置の第4の例示的な具体例を示す概略図であり、

図7 aは、装置の第5の例示的な具体例を示す底面図であり、

図7 bは、図7 aに示される例示的な具体例を示す平面図であり、

図7 cは、図7 aに示される例示的な具体例を示す概略的な側面図であり、

図7 dは、溶出装置の第1の例示的な具体例のためのカバーを示す斜視図であり、

図7 eは、カバーのない、溶出装置の第1の例示的な具体例を示す斜視図であり、

図7 fは、図7 aから図7 cに示される例示的な具体例の斜視図であり、

図8は、装置の第6の例示的な具体例に沿った概略断面図であり、

図9は、コーティングされた電極に沿った概略断面図であり、

図10は、装置の第7の例示的な具体例に沿った概略断面図であり、

図11は、装置の第8の例示的な具体例に沿った概略断面図であり、

図12は、溶出装置の第2の例示的な具体例を示す平面図であり、

図13は、精製および濃縮装置の第2の例示的な具体例に沿った概略断面図である。

図1は、装置の第1の例示的な具体例の概略断面図を示す。容器15は、底部に孔43が開けられた電気泳動緩衝液タンク10の中に保持される。容器15は反応室17を囲み、この反応室17はチャンネル49を介して取出し室50に接続される。反応室17の容積は好ましくは1mlから20mlである。取出し室50は、第1のオリフィス42を封止する第1の浸透膜（透水性膜）30によって、電気泳動緩衝液タンク10に保持された電気泳動緩衝液とイオン伝導性の接続状態にある。取出し室50の容積は好ましくは0.005mlから0.1mlである。第1の浸透膜30はたとえば、核酸は通り抜けないが塩、特にカオトロピック塩（変性用の塩）は通り抜ける、透析膜から形成される。第1の浸



透

膜30はたとえばOリングである可撓性リングによって第1のノズル41上に固定される。たとえばガラス繊維のフリース、シリカ、ガラスビーズ、ガラスで被覆された磁性粒子、陰イオン交換体などのような吸着媒体100が反応室17に保持される。カソード20aは第2のオリフィス80を通過して反応室17内に突出する。アノード20bは電気泳動緩衝液タンク10に入れられた電気泳動緩衝液に浸され、この緩衝液のレベルは70で示される。吸着媒体100の下方では、孔43を通る第2のノズル85が容器15から延びている。第2のノズル85はOリング40によって電気泳動緩衝液タンク10から封止される。取出し室50は取出しオリフィス60を有する。取出し室50は、空気が混入しないように設計されている。取出し室50は特にキャピラリーとして設計されてもよい。

図2は、本質的に、図1に示される第1の例示的な具体例を示す。この場合、スピンカラム90が反応室17に保持される。電気泳動緩衝液タンク10を通る第2のノズル85はここでは設けられない。

図3は、装置の第2の例示的な具体例に沿った概略断面図を示す。この場合、カソード20aは反応室17の外側に置かれる。それは電気泳動緩衝液タンク10の中に直接浸される。反応室17を囲む容器15の部分上には第3のノズル45が設けられ、その第3のオリフィス46は第2の浸透膜31によって封止される。

図4は、図3に示される装置を有する精製および濃縮装置の第1の例示的な具体例に沿った概略断面図を示す。図3に示される装置がx, y, zピペッターの動作領域に置かれ、このx, y, zピペッターの、x, y, z方向にピペッティングするアームが190で示される。x, y, z方向にピペッティングするアーム190は、好ましくは使い捨てのチップであるピペッティングチップ180を保持する。適当なx, y, zピペッターはたとえばスイス国のTECAN, AGから入手可能である。さらに、加熱可能な振とう機フレーム170がx, y, zピペッターの動作領域に配置される。溶解のための反応チューブ150が振とう機フレーム170に保持される。このほかに、溶解のための第1の容器160と

、洗浄溶液を保持するための第2の容器162と、試料用の容器165とが置かれる。185はピペットチップの貯蔵所を示し、210はPCR容器を示す。

電気泳動緩衝液タンク10は充填口125を備え、この充填口125は、間に接続されたポンプ120とともに電気泳動緩衝液槽110に接続される。電気泳動緩衝液タンク10の底に設けられた第2のノズル85および排出用配管140は第2のポンプ130に接続される。好ましくは、第2のポンプ130はぜん動ポンプとして構成される。適当なぜん動ポンプは、たとえば米国カリフォルニア州のcavroから入手可能である。カソード20aおよびアノード20bは電気リード225aおよび225bを介して電源220に接続される。第1のポンプ120、第2のポンプ130、振とうフレーム170、x、y、zピペッターおよび電源220は、処理コンピュータによって制御できるように構成される。このため、精製および濃縮装置の動作を十分に自動化することが可能である。

図5は、容器15の、特に簡単な変形例の平面図を示す。これは平床式アガロースゲル11から作られ、この平床式アガロースゲル11の、横方向の対向する側面上にはカソード20aとアノード20bとが置かれる。平床式アガロースゲル11の中には、吸着媒体を保持するための反応室17を形成する第1の空洞部81と、第2の空洞部61とが設けられる。第2の空洞部61はスロットとして形成される。それは、そこで濃縮された核酸を取出す役割を果たす。

図6aは、装置の第3の例示的な具体例に沿った概略断面図を示す。この場合、容器15は交差接続部材の形で構成される。吸着媒体100は支持フリース302上に置かれる。カソード20aおよびアノード20bは導電性プラスチックのピペットチップとして構成され、これらは電気泳動緩衝液タンク（ここでは図示せず）に接続される。それらはチューブ部材318を介して容器15に接続される。取出し室50に蓄積した核酸は取出しオリフィス60を通じて取出すことができる。

図6bに示されるように、取出し室50と中間室321との間にはさらなる支持フリース303が配置されても良い。図6cに示される第4の例示的な具体例では、プラスチックのピペットチップとして形成された電極20aおよび20b

のオリフィスが封止されている。

図7 aから図7 cには、装置の第5の例示的な具体例がいくつかの図で示される。この場合、容器15は長方形の構成部材からなる。反応室17はボアホール

によって形成される。反応室17の両側には、それぞれカソード20 aおよびアノード20 bを保持するための空洞部320および321が設けられる。空洞部320および321と反応室17との間の壁はイオン伝導性となるよう作られる。空洞部320は電気泳動緩衝液を保持する役割を果たす。それらはストッパ340によって封止される。この実施例における電気泳動緩衝液タンクは、反応室17を囲む2部構成の容器からなる。多数のこのような装置（それらのうちの1つが再び斜視図で図7 fに示される）が、溶出装置の図7 dおよび図7 eに示される第1の例示的な具体例の構成要素となり得る。溶出装置は本質的に、図7 fに示される装置を複数個保持するための多重室容器410で構成される。多重室容器410は、真空接続部401と、溶出装置を加熱するための液体の循環のための接続部402とを有する。図7 dに示されるカバー400には、電極のためのリード226 aおよび226 bが設けられる。

図8は、装置の第6の例示的な具体例を示す。この場合、カソード20 aは反応室17の壁と一体化され、アノード20 bは取出し室50の、対向する壁と一体化される。取出し室50には、浸透性であって、特に半透性である膜310が設けられ、これは核酸を透過させない。膜310は、核酸がアノード20 bに直接送られそこでレドックスプロセスによって破壊されることを防ぐ。吸着媒体100は第2のノズル85の入口において支持フリース302によって支持される。

図9は、コーティングされた電極に沿った概略断面図を示す。金、銀または白金などの貴金属か、または導電性プラスチックから作られるカソードまたはアノード20 aまたは20 bには、複数の層からなるコーティングが設けられる。貴金属またはプラスチックに塗布された第1の層323はビオチニル化ウシ血清アルブミンからなり、その上に積重ねられる第2の層325はポリストレプトアビジンのストレプトアビジンからなり、外側の第3の層324はオリゴヌクレオチ

ドで形成される。

図10に示される装置の第7の例示的な具体例の場合、移動可能な永久磁石312が、そのN極がカソード20aに近接した態様で、容器15の外側に配置される。透明なスナップ式カバー316によって反応室17が封止される。取出し室50は、隔膜328が設けられたスナップ式カバー326によって封止される。

液体の除去または添加のために、隔膜328には針327によって孔を開けることができる。これにより、装置に存在する液体の汚染が回避できる。透明なスナップ式カバー316の上方に配置された光電子増倍管が314で示される。

図11は、第8の例示的な具体例の概略断面図を示す。第7の例示的な具体例とは対照的に、ここでは、移動可能な永久磁石312が、そのS極がアノード20bの外側に近接するように配置される。取出し室50の底は透明である。取出しオリフィス60に対向して、光電子増倍管314が取出し室50の底の下方に置かれる。

図12は、溶出装置の第2の例示的な具体例の平面図を示す。この場合、図11に示される装置の多数が互いに並んで配置される。温度を設定することができるサーモスタットプレート329は装置の長手方向の側面の各々の上に設けられる。

図13は、精製および濃縮装置の第2の例示的な具体例の概略断面図を示す。この場合、図11に示される装置の電極20aおよび20bが電源220に接続されている。図11に示される装置は、自動装置のx, y, zピペッターの、x, y, z方向にピペティングするアーム190の動作領域に置かれる。電源220、廃棄すべき溶液を処分するための第2のポンプ130、永久磁石312を移動させるための装置（ここには図示せず）および自動装置のx, y, zピペッターは、たとえばパーソナルコンピュータのような処理コンピュータによって十分に自動的に制御することができる。

上記の装置の機能を以下に説明する。

核酸を含有し、分析すべき生物学的流体を吸着媒体100と接触させる。この

接触の間に、溶液中に存在する核酸が吸着媒体100に吸着する。たとえばスピ  
ンカラム90のような、核酸を積載した吸着媒体100が、第2のオリフィス8  
0を通して反応室17の中に挿入される。その後、1Vから5000Vの範囲で  
あって、好ましくは、25Vから500Vの範囲である直流電圧が電極20a、  
20bに印加される。結果として、負に荷電した核酸が吸着媒体100から分離  
され、取出し室50の付近に配置されたアノード20bの方向に移動させられる  
。核酸とアノード20bとが直接接触することを避けるために、核酸が通り抜け  
ら

れない第1の浸透膜30が設けられる。核酸はアノード20bに向けて運動する  
ため、核酸は取出し室50に蓄積する。1分から180分間の電気泳動期間の  
後、電気泳動緩衝液に流された電流がオフにされる。その後、濃縮された核酸を  
含む溶出分を取出し室50の取出しオリフィス60を介して取ることができる。

汚染を回避するために、隔膜328を備えたスナップ式カバー326によって  
取出しオリフィス60を封止することができる。溶出分を取出すために、隔膜3  
28に針327で孔を開けることができる。

分離される核酸のタイプに依存して、異なった態様で形成された電極20aお  
よび20bが用いられてもよい。コーティングされ得る、貴金属または導電性プ  
ラスチックから作られた電極の使用は適当である。

この発明による装置は、化学ルミネセンスを検出するためのデバイスと組合せ  
ることができる。この目的のために、容器15の付近に光電子倍增管314が配  
置される。まず、核酸が電気泳動によって吸着媒体100からアノード20bに  
向けて移動させられる。その後、アノード20bの領域において、たとえばポリ  
メラーゼ連鎖反応による、核酸の増幅を行なうことができる。その後、磁性粒子  
の添加により、増幅された核酸が結合する。永久磁石312をアノード20bに  
案内することにより、核酸を積載した磁性粒子がアノード20bの方に引き寄せ  
られる。化学ルミネセンス緩衝液を添加し、電極20a、20bに電圧を印加し  
た後、化学ルミネセンスを開始する。この方法で放射された光は光電子増倍管3  
14によって検出される。

上述の機能は自動装置の x, y, z ピペッターによって自動化することができる。この手段を用いると、この発明による多数の装置を自動的に連続して操作することが可能である。

核酸は、図4および図13に示される精製および濃縮装置を用いて自動的に分離することができる。この場合、以下の制御プログラムが好都合であることがわっている。

工程番号	装置 モジュール	作業工程
1	x, y, z ピペッター	貯蔵所 185 からピペットチップを取出す
2	x, y, z	試料の容器 165 に行く

	ピペッター	
3	x, y, z ピペッター	210 $\mu$ l の試料を取出す
4	x, y, z ピペッター	反応チューブ 150 に行く
5	x, y, z ピペッター	200 $\mu$ l を分配する。
6	x, y, z ピペッター	ピペットチップを廃棄する
7	x, y, z ピペッター	貯蔵所 185 からピペットチップを取出す
8	x, y, z ピペッター	第 1 の容器 160 に行く
9	x, y, z ピペッター	710 $\mu$ l の溶解試薬を取出す
10	x, y, z ピペッター	反応チューブ 150 に行く
11	x, y, z ピペッター	700 $\mu$ l の溶解試薬を分配する
12	x, y, z ピペッター	ピペットチップを廃棄する
13	サーモミキサ	1 分間振とうする
14	サーモミキサ	75℃に加熱する
15	コントローラ	10 分間待つ
16	サーモミキサ	25℃に冷却する
17	x, y, z ピペッター	貯蔵所 185 からピペットチップを取出す
18	x, y, z ピペッター	反応チューブ 150 に行く
19	x, y, z ピペッター	810 $\mu$ l の溶解混合物を取出す
20	x, y, z ピペッター	第 2 の開口部 80 に行く
21	x, y, z ピペッター	800 $\mu$ l の溶解混合物を分配する
22	x, y, z ピペッター	ピペットチップを廃棄する
23	ポンプ (130)	吸着媒体を介して溶解混合物をポンプにより汲み上げて廃棄する
24	x, y, z ピペッター	貯蔵所 185 からピペットチップを取出す
25	x, y, z ピペッター	第 2 の容器 162 に行く

26	x, y, z ピペッター	710 $\mu$ l の洗浄試薬を取出す
27	x, y, z ピペッター	第2の開口部80に行く
28	x, y, z ピペッター	700 $\mu$ l の洗浄溶液を分配する
29	x, y, z ピペッター	ピペットチップを廃棄する
30	第2のポンプ 130	吸着媒体を介して洗浄溶液をポンプにより汲み上げて廃棄する
31	第1のポンプ 120	電気泳動緩衝液をポンプ動作によりタンクの中に入れる
32	x, y, z ピペッター	貯蔵所185からピペットチップを取出す
33	x, y, z ピペッター	電気泳動緩衝液槽110に行く
34	x, y, z ピペッター	250 $\mu$ l の電気泳動緩衝液を取出す
35	x, y, z ピペッター	第2の開口部80に行く
36	x, y, z ピペッター	ピペットチップを廃棄する
37	電源 220	電極20a、20bに電圧を印加する
38	コントローラ	20分間待つ
39	x, y, z ピペッター	貯蔵所185からピペットチップを取出す
40	x, y, z ピペッター	60 $\mu$ l の分離した核酸を取出しオリフィス60から取出す
41	x, y, z ピペッター	PCR容器210に行く
42	x, y, z ピペッター	50 $\mu$ l をPCR容器210に分配する
43	x, y, z ピペッター	ピペットチップを廃棄する
44	第2のポンプ 130	電気泳動緩衝液をタンクからポンプにより汲み上げて廃棄する

## 例1

スピンカラムおよび電気泳動による全血試料の分析

すべての試薬がHildenのQiagenによるQIAamp（商標）Blood Kit（カタログ番号29104）から取出される。製造者による手順に従って核酸の溶解



および吸着の後に、ガラス繊維のフリースがQIAampスピncラムから取出され、図5に示される特別に準備された平床式アガロースゲルに置かれる。第1の空洞部81はガラスのフリースを保持するための役割を果たし、第2の凹部61は電気泳動緩衝液によって満たされる。この態様で、核酸を電気泳動によりガラスフリースから溶出し、それに続くアガロースゲルおよび第2の空洞部61に移動させることができる。分離、濃縮した核酸を第2の空洞部61から取出した。

## 例2

### 血しょう試料の分析

すべての試薬が、HildenのQiagenによるQIAamp（商標）Blood Kit（カタログ番号29104）から取出される。分析のために、ガラス繊維のフリースがQIAampスピncラムから取出され、底部排出口に位置付けられるように、図1に示される装置の中に挿入された。反応容器全体の容積は2mlであった。製造者による操作説明に従って200 $\mu$ lの血しょうが処理された。遠心分離の代わりに、エッペンドルフのダイヤフラムポンプを用いた吸引が行なわれた。電気泳動溶出のために、Andrews, A.T. (Andrew A.T.: Electrophoresis, Clarendon Press, Oxford, 1985, p. 160) によって説明されている電気泳動緩衝液が用いられた。用いられた浸透膜はハイデルベルグ (Heidelberg) のNeolabによる透析チューブ（カタログ番号2-9022）であった。用いられた電極20aおよび20bは、白金／ルテニウム合金の直径が0.3mmのワイヤから作られ、電源としては、DorfenのHölzelによる電気泳動用電源が用いられた。核酸を含有する30 $\mu$ lの溶出分が取出しオリフィス60から取出された。

## 例3

### ニワトリの血液からのDNAの分離

殺したばかりの肥育した白色ニワトリの頸動脈から全血が収集され、0.06g EDTA／全血mlの濃度で、エチレンジアミンテトラ酢酸 (sigma, Munich, カタログ番号E-5513) と直ちに混合された。EDTA／全血を部分的に凍らせて-15℃で貯蔵した。すべての試薬がBoehringer Mannheimに

よる「高純度PCRテンプレート調製キット（“High Pure PCR Template Preparation Kit”）」（カタログ番号1 796 828）から取出された。100  $\mu$  lのEDTA/全血（上記）を、いずれの場合も前述の試薬キットからの、溶解緩衝液200  $\mu$  lおよびプロテイナーゼK 60  $\mu$  lと混合し、70℃で15分間インキュベートした。室温に冷却した後、100  $\mu$  lのイソプロパノール（Roth, Karlsruhe, カタログ番号9866）を添加し、混合物を勢いよく振とうする。その後、真空ポンプ（Eppendorf, Hamburg, No.4151）を用いてガラスのフリースを介して粘性の反応混合物を吸引する。その後、80%のエタノール（Roth, Karlsruhe, カタログ番号5054）を含有する500  $\mu$  lの（上記のキットからの）洗浄緩衝液によってフリースを5回洗浄した。フリースをフィルタチューブから取出し、図5に示される装置中、第1の空洞部81の中に移動させた。次いで、約0.5 mlの予め70℃に加熱した電気泳動緩衝液（10 mM トリス-HCl [Sigma, Munich カタログ番号T-8529]、5 mM 酢酸ナトリウム [Sigma, Munich カタログ番号S-3272] および0.5 mM EDTA [上記] pH 8.2）を第1の空洞部81の中のフリース上にピペットで移した。その後、約60℃において、最高で10 mAの直流電圧を印加するこ

とによって電氣的溶離を行なった。用いられた電源は Dorfен の Hölzel による電気泳動用変圧器（番号0628/1985）であった。所定時間（10分から15分）のフラクション約50  $\mu$  lをエッペンドルフピペットを用いてオリフィス（61）から取出して集めた後に、1から7のフラクションで溶出液を収集した。フラクションはアガロースゲル（40  $\mu$  lの臭化エチジウム溶液（蒸留水中100 mgの臭化エチジウム [Sigma, Munich No. E-8751]）を含有する60 mlの電気泳動緩衝液中0.05 mgのアガロース）で分析された。40  $\mu$  lの溶解混合物が対照として用いられた。対照および15分間の電氣的溶出後のフラクションは、約40 V、最高で50 mAの電気泳動5分間の後、Roger Electronic Products (No. MD-1782GS) のUVランプ下での照明によっ

て、蛍光性のバンドを示した。用いられた電源は Dorfен の Hölzel による電気泳動用変圧器（番号0628/1985）であった。

コーティングされた導電性プラスチック電極の製造 (図9)

ビオチニル化ウシ免疫グロブリンG (B-I g G) がまず調製された。この目的のために、0.5 ml のB-I g G溶液 (1 ml のP B S ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.76 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.56 g/l;  $\text{NaCl}$  8 g/l; pH 7.25) 中2 mg のB-I g G (Boehringer Mannheimのカタログ番号1293621103) が、P B SおよびDMSO中6  $\mu$  l のD-ビオチノイル- $\epsilon$ -アミノカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液 (Boehringer Mannheimのカタログ番号1418165のビオチン標識キット (Biotin Labeling Kit) に従ったバッチ) と混合され、マグネティックスターラーによって室温で2.5時間攪拌され、その後1晩放置された。ビオチン：B-I g Gのモル比はこのバッチでは20：1である。

導電性プラスチックをビオチニル化B-I g Gによってコーティングするために、4 mmの直径を有するディスクが、PRE-ELEC TP 4474 (Premix Oy, Finland) から射出成形プロセスにおいて製造されたブランク片から切取られ、コーティングされていないマイクロタイタープレートのウェルに置かれ、0.2 ml のコーティング緩衝液 ( $\text{NaHCO}_3$  4.2 g/l; pH 9.6) の溶液中で3回洗浄され、次いで40 ml のコーティング緩衝液 ( $\text{NaHCO}_3$  4.2 g/l; pH 9.6) の溶液、そして6  $\mu$  l のB-I g Gビオチン溶液中に置かれた。1晩かけてコーティングが行なわれた。

その後ディスクは3回洗浄され、これは毎回100 ml のミリ (milli) -Q水によって行なわれ、固相と液相は沈降または遠心分離によって分離された。後に、ディスクは再び40 ml のP B S中に入れられた。

#### 例5

P C Rによって増幅された材料を検出するための電氣的溶離、増幅および電子化学ルミネセンス測定を用いる試料の調製。

分離、増幅および化学ルミネセンス測定を行なうための図14に示される装置は、下記のプログラム工程を有するコンピュータプログラムによって自動的に制御された。

プロセスモジュール	個々の工程
試料の調製	
溶解	試料、溶解混合物および プロテイナーゼ K をピペットで反応室 17 の中に入れる
	反応室 17 を閉じる
	反応室 17 を 70℃ に加熱する
	反応室 17 を室温に冷却する
	反応室 17 開く
	イソプロパノールを添加する
	第 2 のノズル 85 を介して吸引により反応 室 17 から反応混合物を引出す
電氣的溶離	溶出緩衝液を添加する
	電極 20a、20b に電圧を印加する
	核酸が取出し室 50 に移動する
増幅	PCR 混合物を取出し室 50 に添加する
	第 2 のノズル 85、第 2 のオリフィス 80 および取出しオリフィス 60 を閉じる
	取出し室 50 を周期的に加熱および冷却す る
変性	取出しオリフィス 60 を開く
プローブのアニール	RU プローブを加える
	取出しオリフィス 60 を閉じる
	取出し室 50 を加熱および冷却する
検出	取出しオリフィス 60 を開く
	取出しオリフィス 60 を介して SA 磁性粒子 を添加する
	取出しオリフィス 60 を閉じる
磁気分離	取出し室 50 に対して永久磁石 312 の磁界 を与える
	吸引によって取出し室 50 から反応混合物 を引出す
磁性粒子の洗浄 (オプション)	取出しオリフィス 60 を介して洗浄溶液を 添加する
	取出し室 50 に対し磁界を除去する
	第 2 のノズル 85 を介して吸引により 洗浄溶液を引出す
	取出しオリフィス 60 を介してアッセイ緩 衝液を添加する
電気化学ルミネセンス測定	電極 20a、20b に電圧を印加する
	光電子増倍管 314 によってルミネセンス 測定を行なう

1 0	電気泳動緩衝液タンク
1 1	平床式アガロースゲル
1 5	容器
1 7	反応室
2 0 a	カソード
2 0 b	アノード
3 0	第1の浸透膜
3 1	第2の浸透膜
4 0	リング
4 1	第1のノズル
4 2	第1のオリフィス
4 3	孔
4 4	第2のノズル
4 5	第3のノズル
4 6	第3のオリフィス
4 9	チャネル
5 0	取出し室
6 0	取出しオリフィス
6 1	第2の空洞部
7 0	充填レベル
8 0	第2のオリフィス
8 1	第1の空洞部
8 5	第2のノズル
9 0	スピンカラム
1 0 0	吸着媒体
1 1 0	電気泳動緩衝液槽
1 2 0	第1のポンプ
1 2 5	充填口

130	第2のポンプ
140	排出線
150	反応チューブ
160	第1の容器
162	第2の溶器
165	試料容器
170	振とう機フレーム
180	ピペットチップ
185	ピペットチップの貯蔵所
190	x, y, z 方向にピペッティングするアーム
210	P C R 容器
220	電源
225a,b	電気リード
302	支持フリース
303	さらなる支持フリース
310	半透膜
312	永久磁石
313	磁性粒子
314	光電子増倍管
316	透明なスナップ式カバー (光学窓)
318	チューブ片
320,321	空洞部
323	第1の層
324	第3の層
325	第2の層
326	スナップ式カバー
327	針
328	隔膜
329	加熱プレート

- 340    ストッパー
- 400    カバー
- 401    真空接続部
- 402    接続部
- 410    多重室容器

【図1】

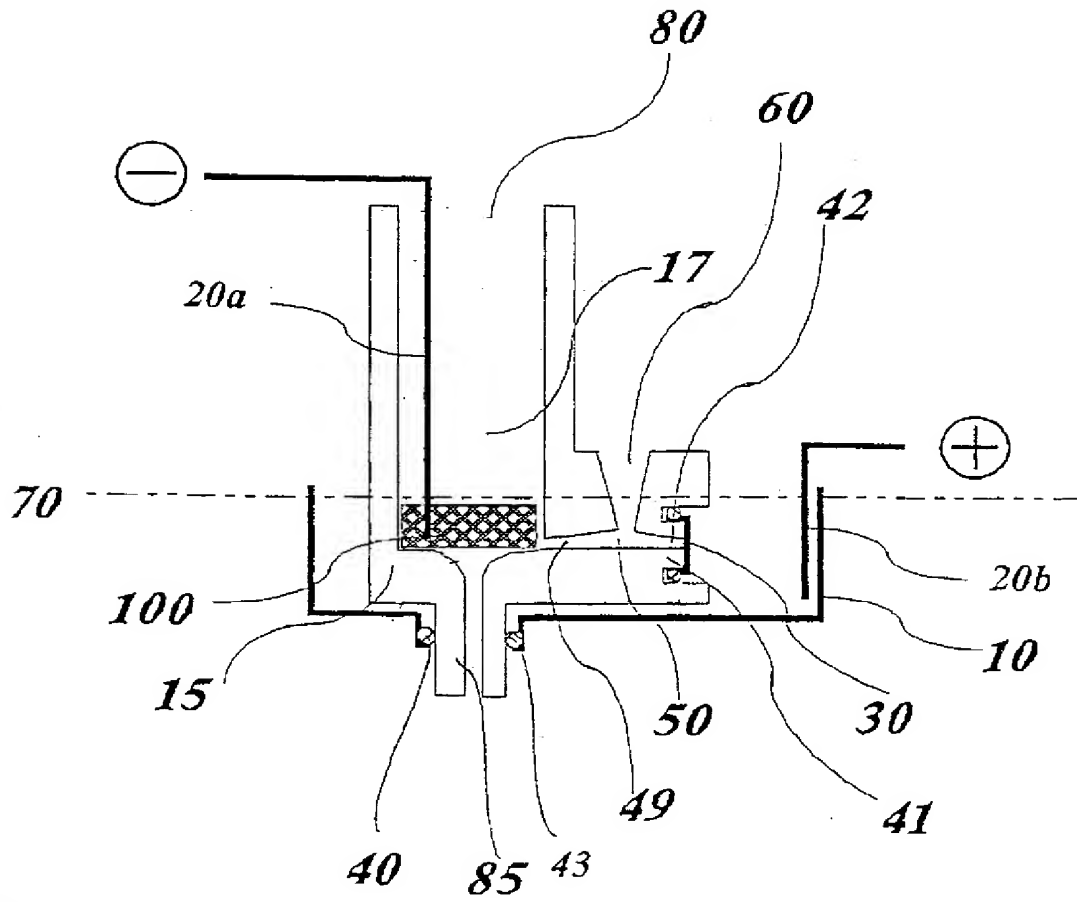


Fig. 1

【図2】

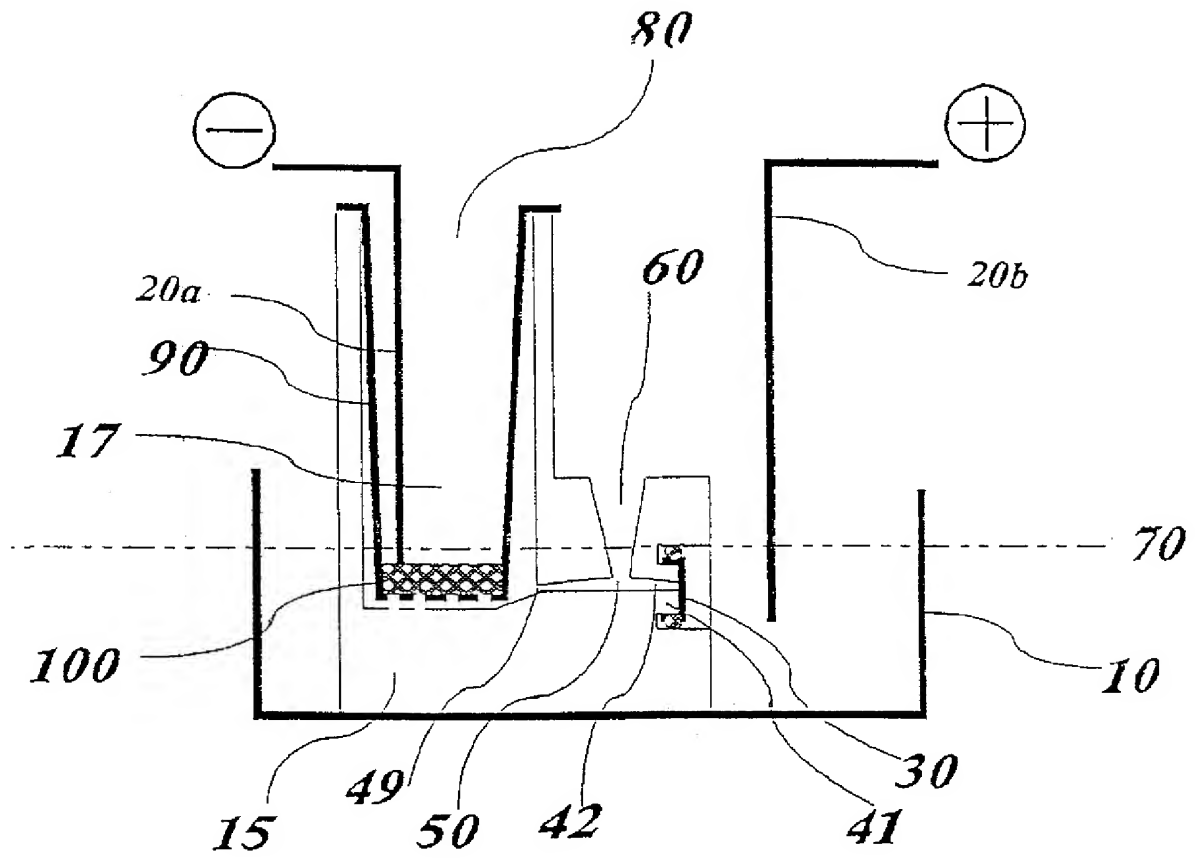


Fig. 2



【図3】

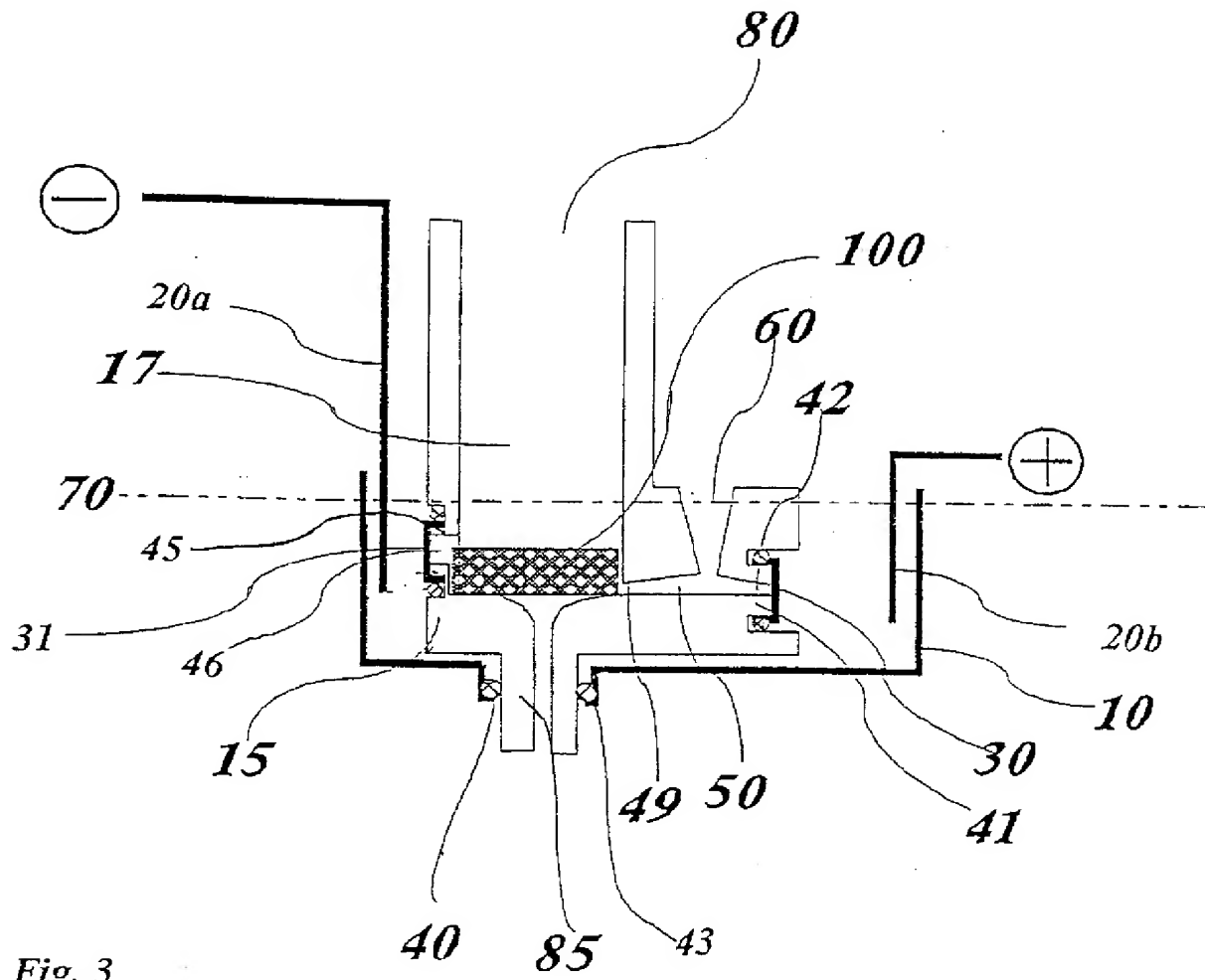


Fig. 3



【図5】

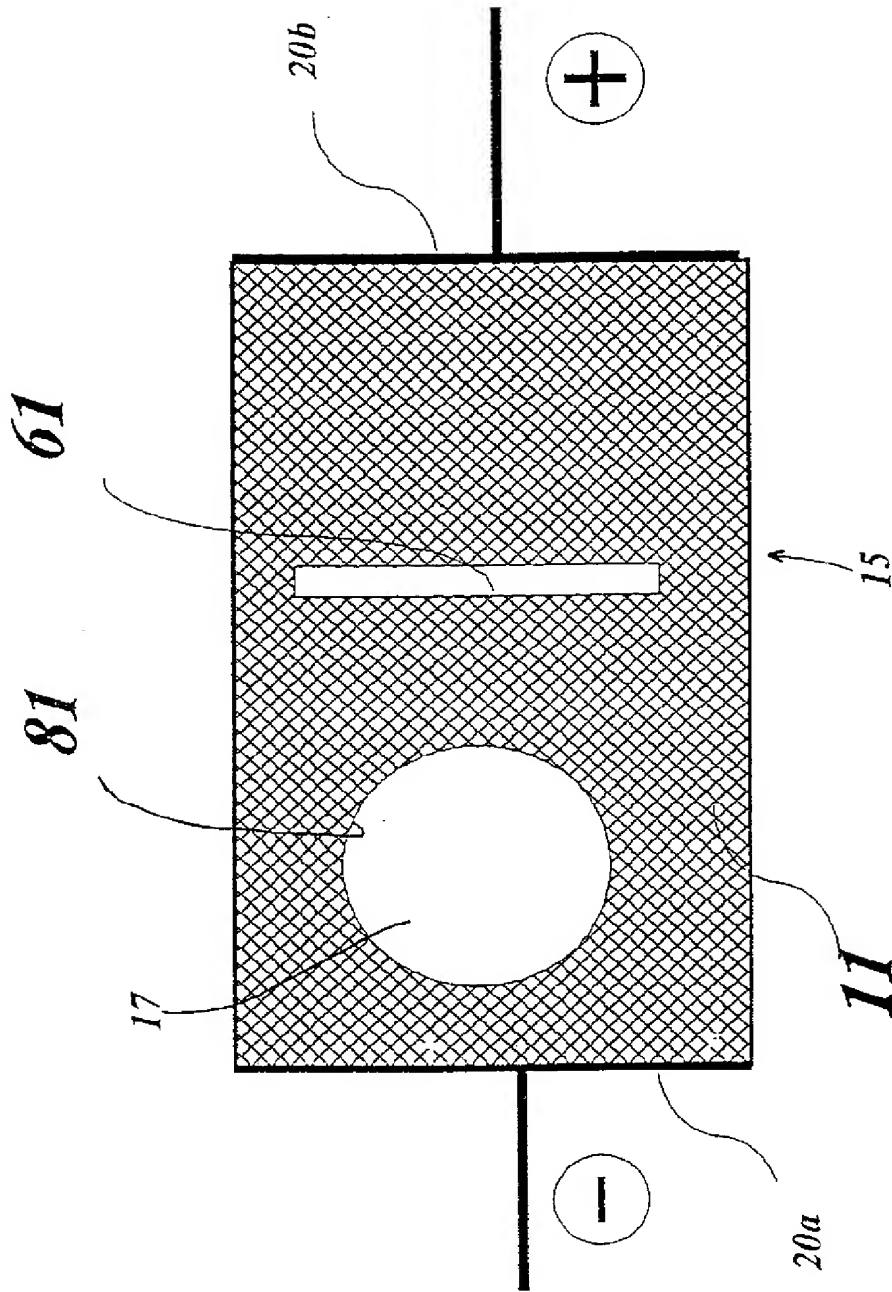
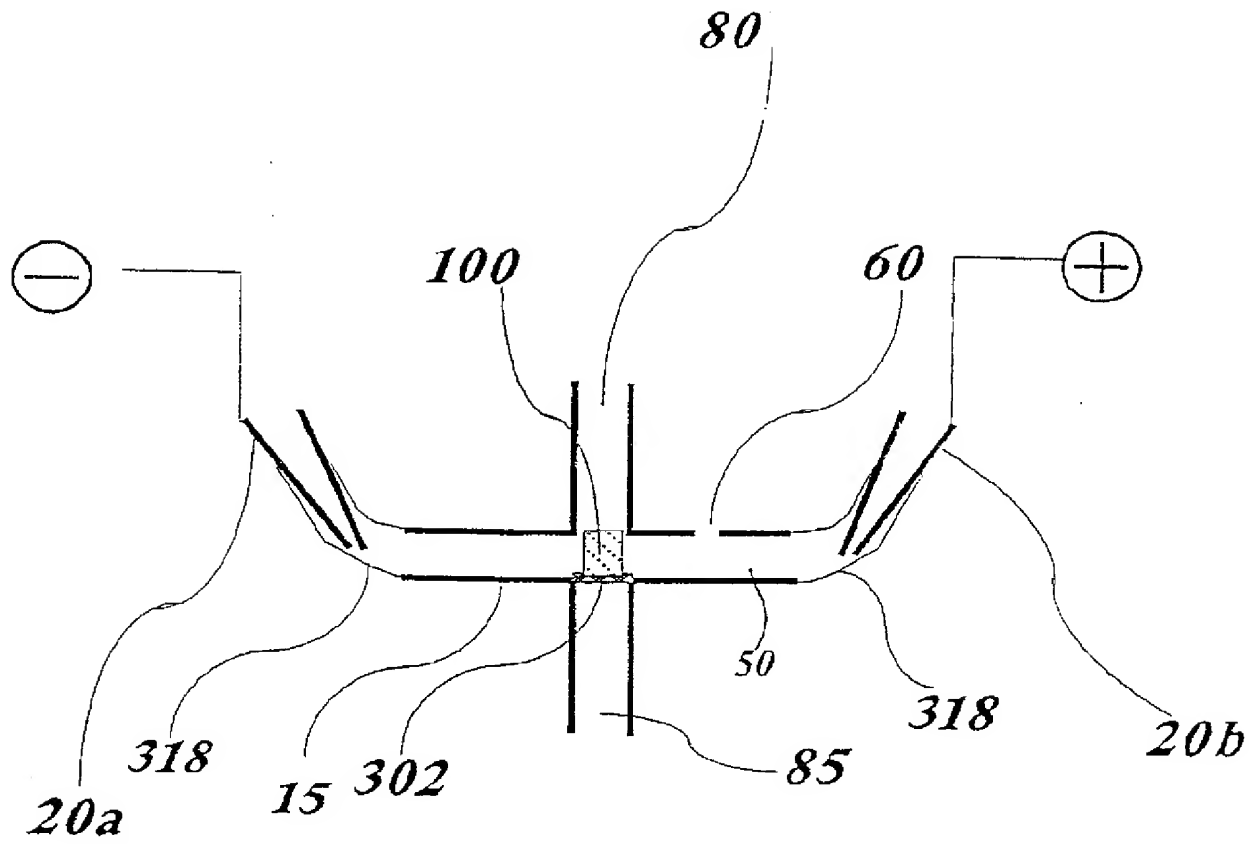


Fig. 5

【図6】

*Fig. 6a*

【図6】

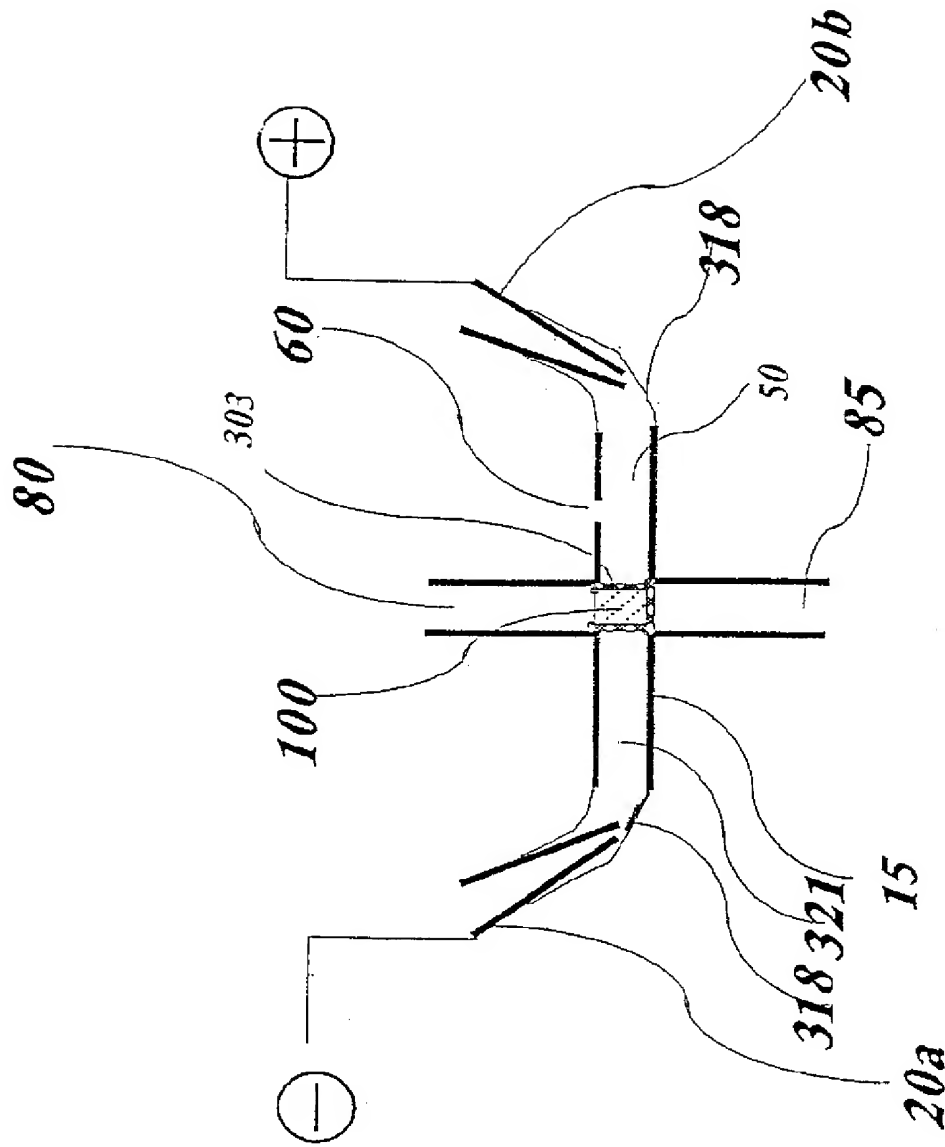


Fig. 6b

【図6】

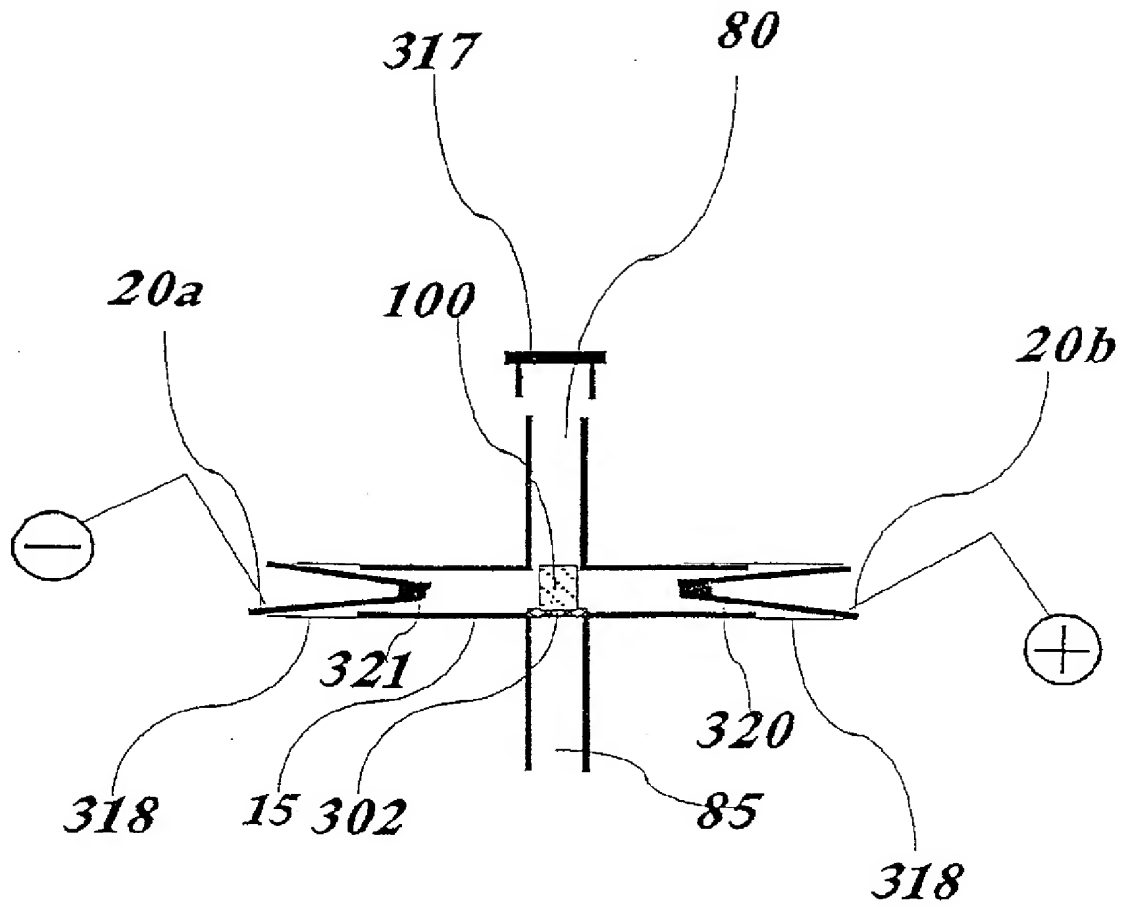


Fig. 6c

【図7】

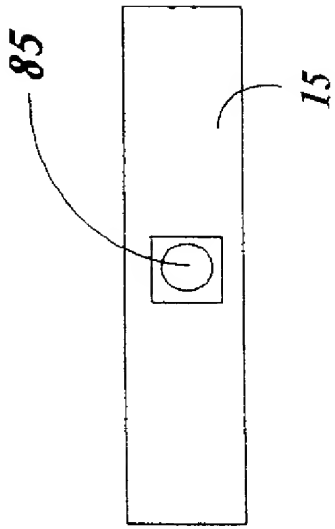


Fig. 7a

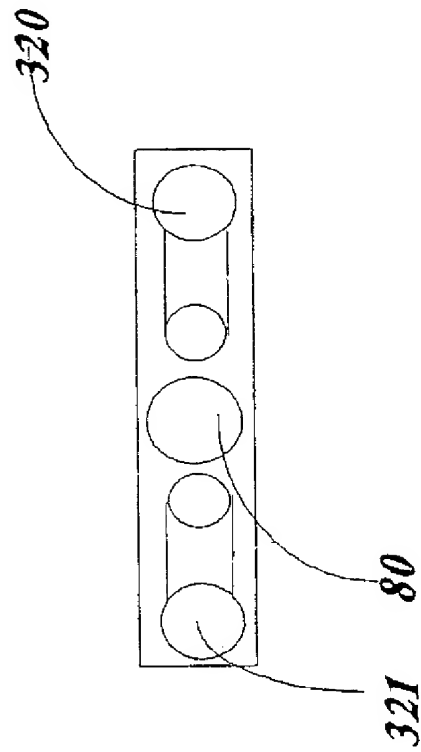


Fig. 7b

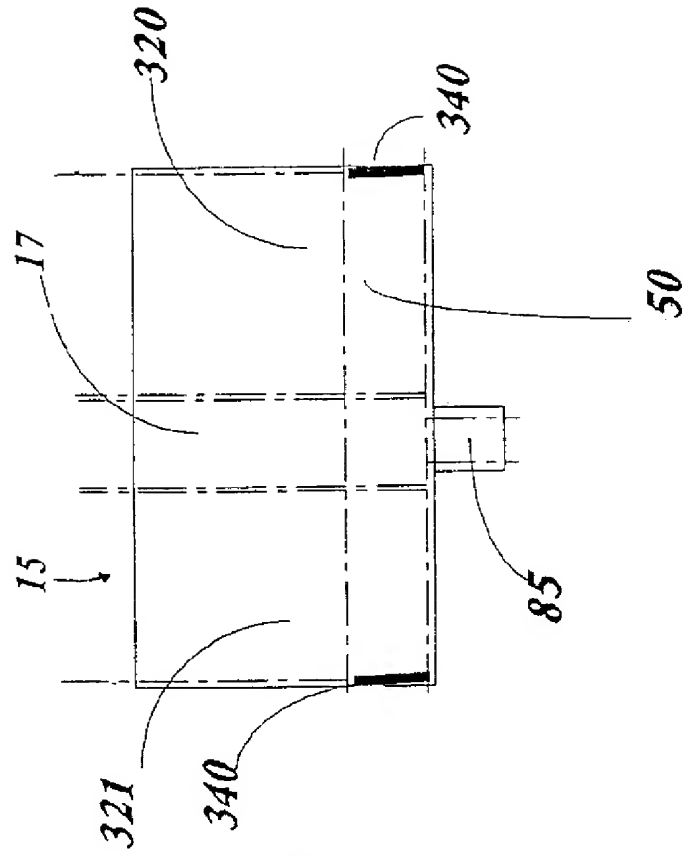
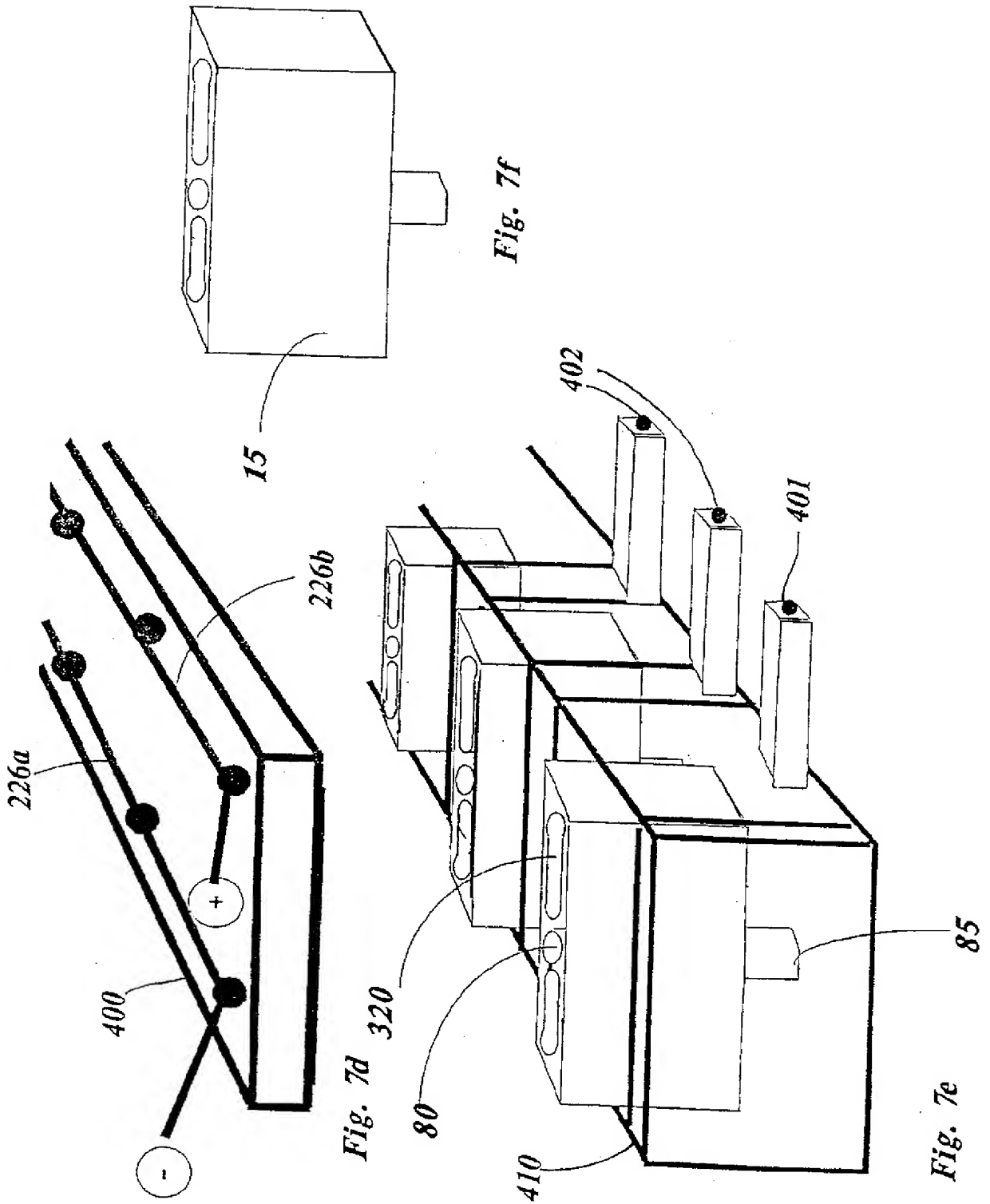


Fig. 7c

【図7】





【図8】

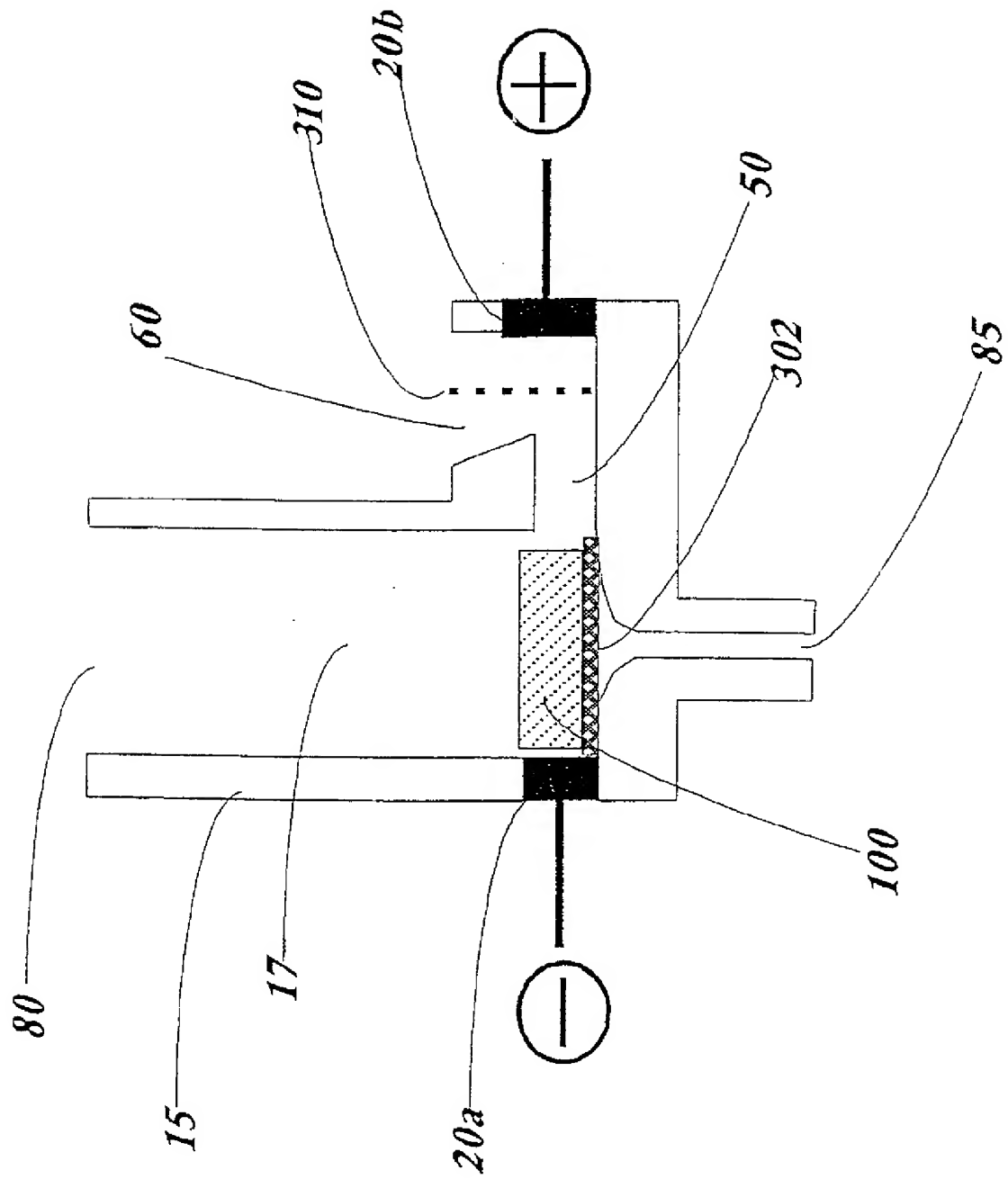
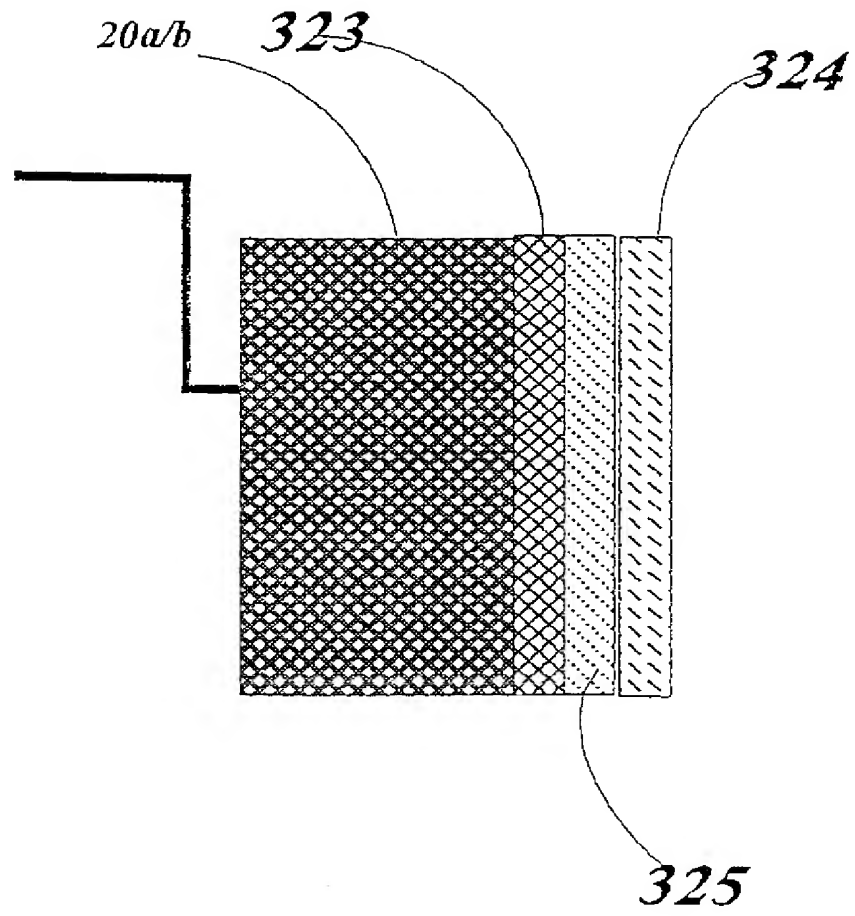


Fig. 8

【図9】

*Fig. 9*

【図10】

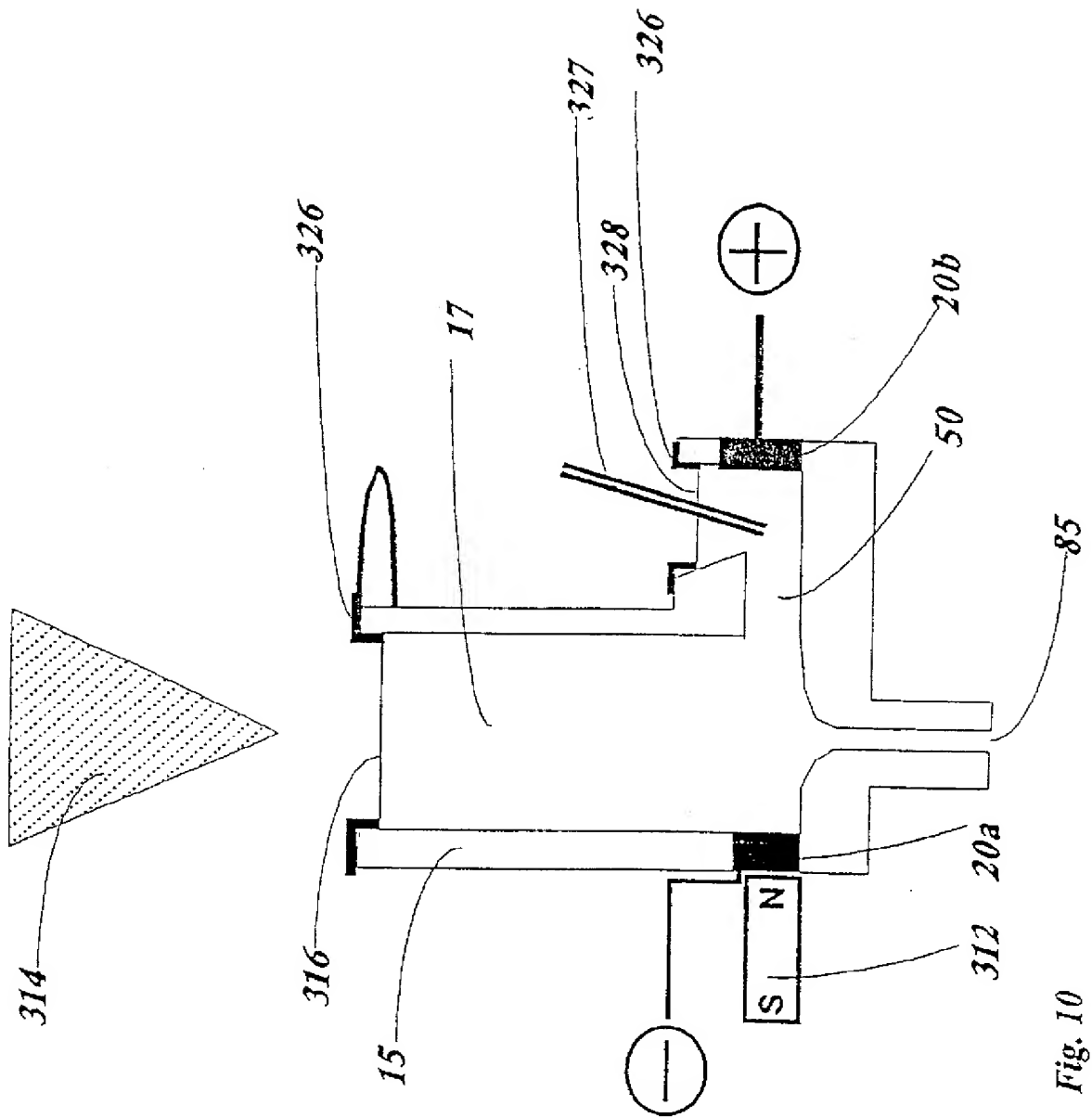


Fig. 10

【図11】

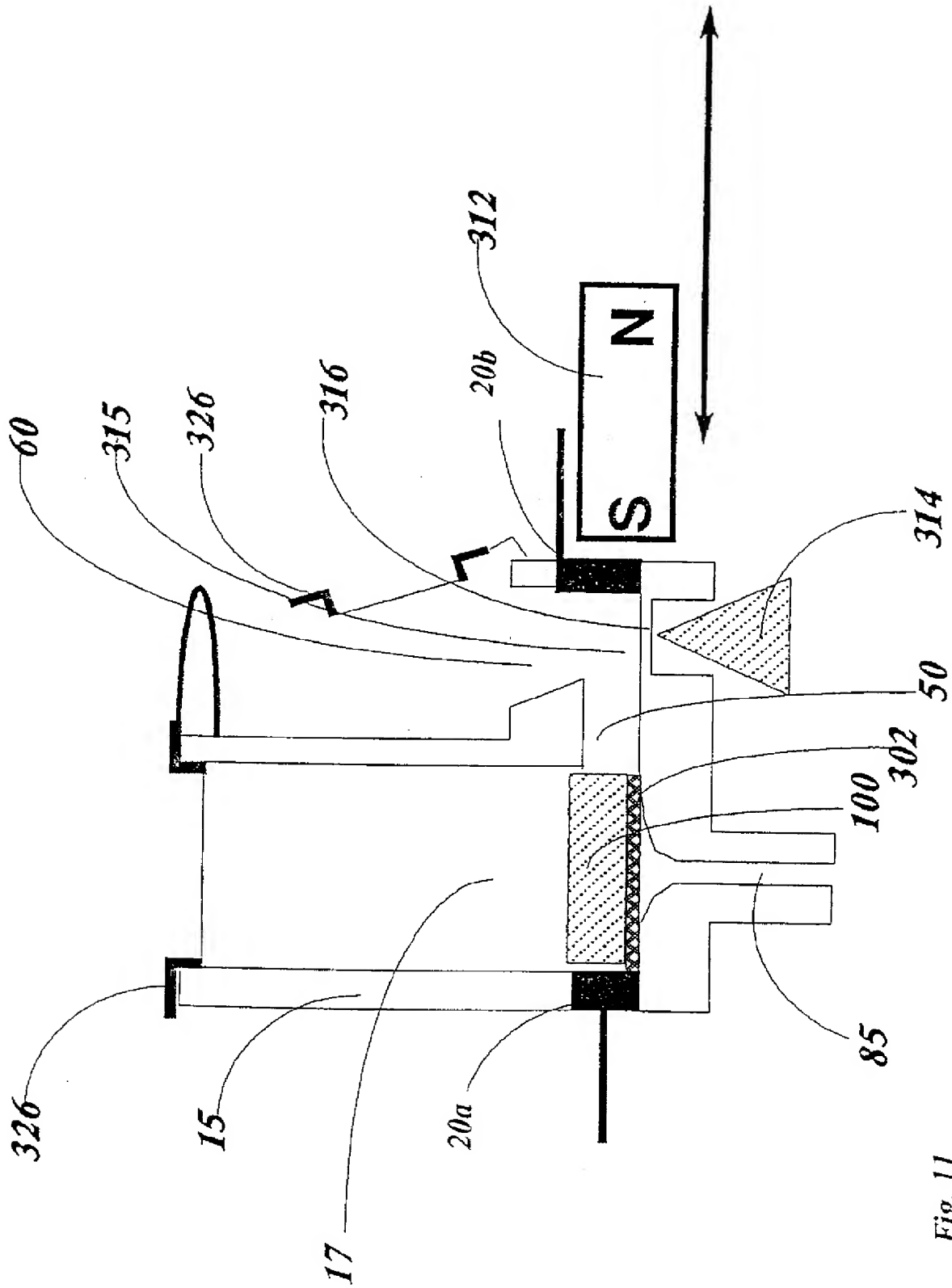


Fig. 11

【図12】

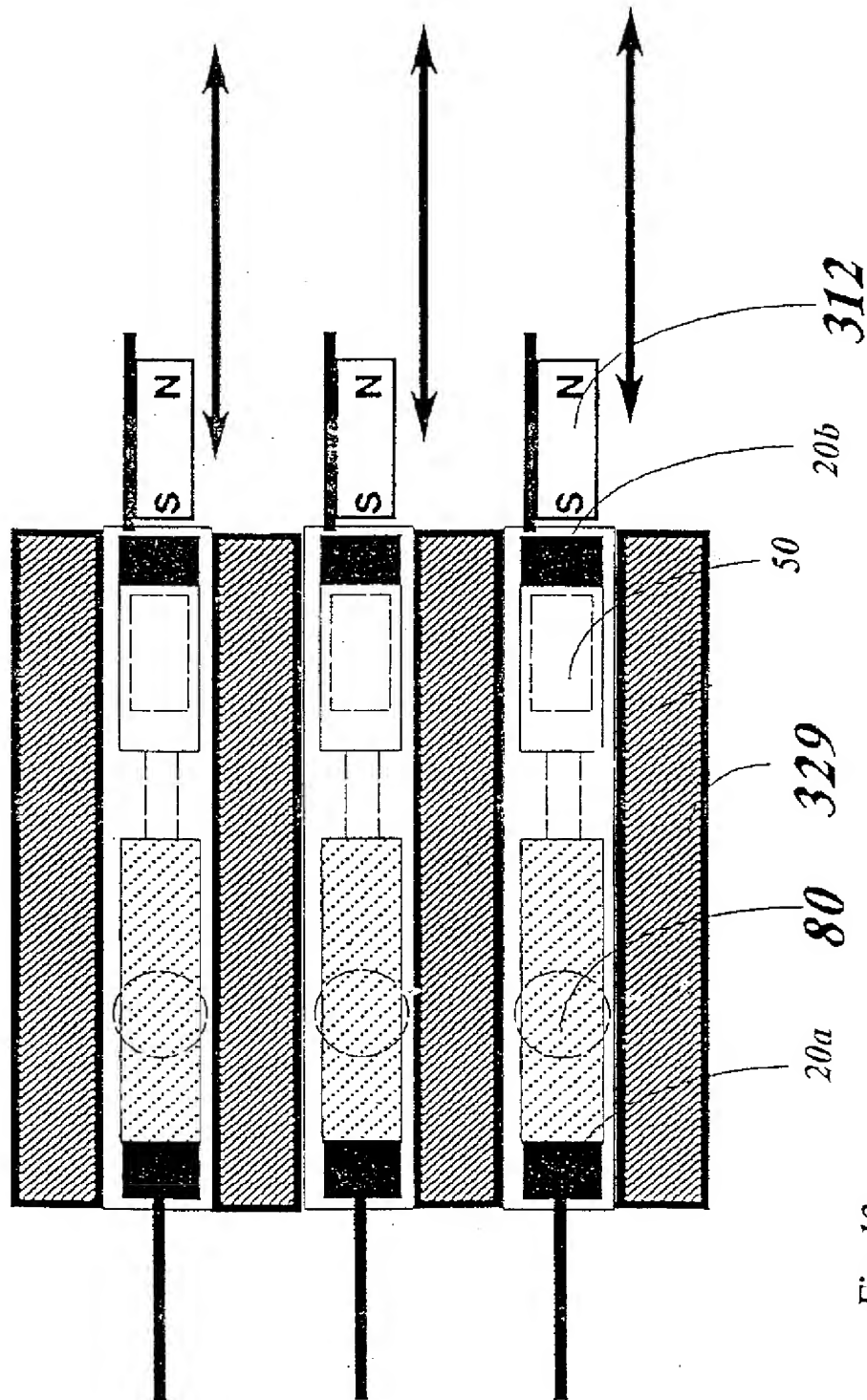
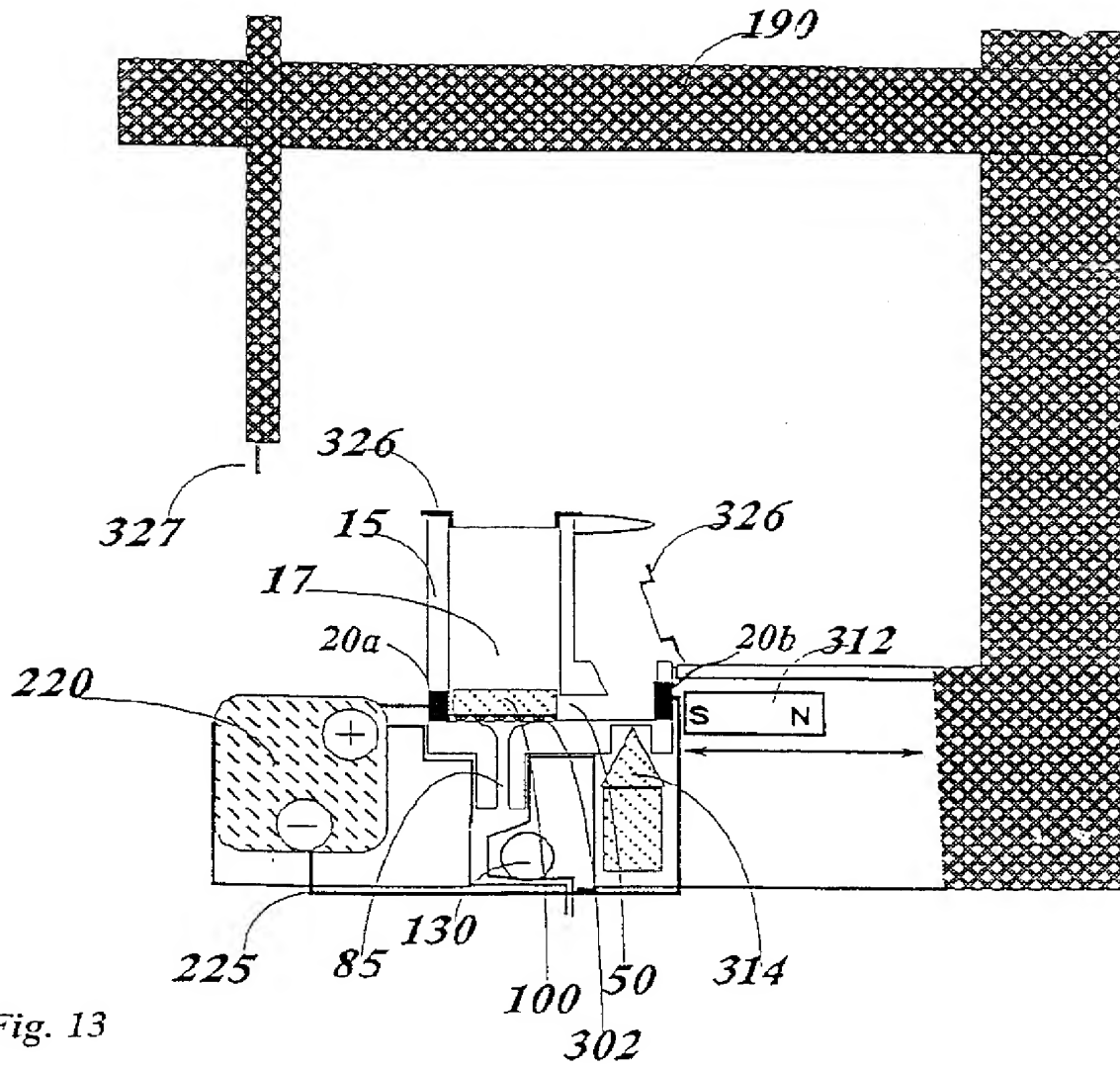


Fig. 12

【例 13】



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年3月19日（1998. 3. 19）

【補正内容】

請求の範囲

1. 核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から汚染のない核酸の分離を行なうための方法であって、

a) 反応室（17）に保持される吸着媒体（100）に前記核酸を結合させ、

b) 前記吸着媒体（100）から前記核酸を溶出させ、

c) 電気泳動によって反応室（17）から、そこに接続された取出し室（50）にチャンネル（49）を介して前記核酸を移動させかつ前記取出し室で濃縮する、方法。

2. 前記吸着媒体（100）が前記吸着の後に洗浄されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

3. 緩衝液の変更または電気泳動によって前記核酸が前記吸着媒体（100）から溶出されることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

4. 前記取出し室（50）に存在する溶出容積が、0.005mlから0.1mlの範囲であり、元の試料の容積よりも小さいことを特徴とする、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

5. 前記核酸が、前記吸着の前に溶解によって放出されることを特徴とする、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

6. 生物学的流体または懸濁液が、液化によって固体材料から調製されることを特徴とする、請求項1から5のいずれかに記載の方法。

7. 前記吸着媒体（100）が、シリカゲル、ガラス粒子、ガラス繊維のフリースまたはイオン交換材料からなることを特徴とする、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

8. 前記吸着媒体（100）が、ガラスによりコーティングされた磁性粒子からなり、前記磁性粒子に吸着した前記核酸が磁石（312）によって分離されることを特徴とする、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

9. 前記溶出の後にハイブリダイゼーションが行なわれることを特徴とする、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

10. 前記溶出の後に増幅が行なわれることを特徴とする、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

11. 前記溶出の後に化学ルミネセンス検出が行なわれることを特徴とする、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

12. 核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から汚染のない核酸の分離を行なうための装置であって、前記核酸が積載される吸着媒体(100)を保持するための反応室(17)がチャンネル(49)を介して取出し室(50)に接続され、前記核酸を、電気泳動デバイス(20a, 20b)によって前記反応室(17)から前記取出し室(50)に移動させることができかつ前記取出し室で濃縮することができることを特徴とする、装置。

13. 前記反応室(17)が、電気泳動緩衝液タンク(10)によって囲まれることを特徴とする、請求項12に記載の装置。

14. 前記反応室(17)が、イオン伝導性の態様で前記電気泳動緩衝液タンク(10)に接続されることを特徴とする、請求項13に記載の装置。

15. 前記反応室(17)が、前記電気泳動緩衝液タンク(10)に置かれることを特徴とする、請求項13または14に記載の装置。

16. 前記反応室(17)が、少なくとも1つのオリフィス(80)を介して充填および排出され得ることを特徴とする、請求項12から15のいずれかに記載の装置。

17. 核酸のための吸着媒体(100)が、前記反応室(17)に保持されることを特徴とする、請求項12から16のいずれかに記載の装置。

18. 前記イオン伝導性の接続部が、核酸を保持する少なくとも1つの浸透膜(31)によって形成されることを特徴とする、請求項12から17のいずれかに記載の装置。

19. 前記装置が熱可塑性材料から作られることを特徴とする、請求項12から18のいずれかに記載の装置。



20. 前記電気泳動デバイスが少なくとも2つの電極(20a, 20b)を有し、前記少なくとも2つの電極のうちの少なくとも1つは前記電気泳動緩衝液タンク(10)の中に突出するか、またはその構成要素であることを特徴とする、請求項12から19のいずれかに記載の装置。

21. 前記電気泳動デバイスが少なくとも2つの電極(20a, 20b)を有し、

前記少なくとも2つの電極のうちの少なくとも1つは前記取出し室(50)の中に突出するか、前記取出し室(50)を囲む容器(15)の構成要素であることを特徴とする、請求項12から19のいずれかに記載の装置。

22. 前記電極(20a, 20b)のうちの1つが前記反応室(17)内に突出するか、前記反応室(17)を囲む前記容器(15)の構成要素であることを特徴とする、請求項20または21に記載の装置。

23. 前記電極(20a, 20b)のうちの少なくとも1つが、導電性プラスチックから作られることを特徴とする、請求項20から22のいずれかに記載の装置。

24. 前記導電性プラスチックが、グラファイト、鉄、銀または他の金属などの導電性添加物を含むことを特徴とする、請求項23に記載の装置。

25. 前記電極(20a, 20b)の抵抗が100MΩ未満であることを特徴とする、請求項20から24のいずれかに記載の装置。

26. 前記電極(20a, 20b)がコーティングを有することを特徴とする、請求項20から25のいずれかに記載の装置。

27. 前記電極(20a, 20b)の前記コーティングが複数の層(323, 324, 325)からなることを特徴とする、請求項26に記載の装置。

29. 前記結合可能なタンパク質が、抗体、抗原または他のリガンドーレセプター対の構成要素であることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

30. 前記生体高分子が、核酸がそれに結合し得るタイプのものであることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

31. 前記生体高分子がオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、請求項2

8に記載の装置。

32. 前記生体高分子がタンパク質様アミノ酸構造物（PNA構造物）であることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

33. 前記層（323, 324, 325）のうちの1つが、化学反応性のリンカー分子からなることを特徴とする、請求項27に記載の装置。

34. 前記容器（15）の壁に2つの電極（20a, 20b）が互いに対向して設けられることを特徴とする、請求項20または21に記載の装置。

35. オンおよびオフに切換えることができる、磁界を発生するための手段（312）が、前記磁界が前記容器（15）を透過できるような態様で配置されることを特徴とする、請求項12から34のいずれかに記載の装置。

36. 好ましくは光電子増倍管（314）である検出装置が前記容器（15）の付近に配置されることを特徴とする、請求項12から35のいずれかに記載の装置。

37. 前記容器（15）が光学窓（316）を有することを特徴とする、請求項36に記載の装置。

38. 前記装置に割当てられた前記電極（20a, 20b）が、互いに電氣的に接続されかつ電源（220）に接続されることを特徴とする、請求項12から37のいずれかに記載の複数の装置を有する溶出装置。

39. 前記装置が、96ウェルマイクロ滴定プレートの形式で幾何学的に配置されることを特徴とする、請求項38に記載の溶出装置。

40. x, y, z方向にピペッティングするアーム（190）、

サーモスタットが付けられた振とう機フレーム（170）、

周期的な加熱および冷却のための加熱／冷却媒体（329）、

電源（220）、

少なくとも2つの電極（20a, 20b）、

少なくとも1つのポンプ（120, 130）、

少なくとも1つの磁石（312）、および

少なくとも1つの光電子増倍管（314）のデバイスのうち少なくとも1つが

設けられていることを特徴とする、請求項12から37のいずれかに記載の装置または請求項38または39に記載の溶出装置を有する、精製および濃縮装置。

41. 前記装置、前記溶出装置および単数または複数の前記デバイスが、請求項1から11のいずれかに記載の方法を行なうための処理コンピュータによって自動的に制御され得ることを特徴とする、請求項40に記載の精製および濃縮装置。

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年5月12日（1998. 5. 12）

【補正内容】

#### 請求の範囲

28. 少なくとも1つの前記層（323, 324, 325）が、結合可能なタンパク質から形成されることを特徴とする、請求項27に記載の装置。

【手続補正書】

【提出日】平成11年7月29日（1999. 7. 29）

【補正内容】

#### 請求の範囲

1. 核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から汚染のない核酸の分離を行なうための方法であって、

- a) 反応室（17）に保持される吸着媒体（100）に前記核酸を結合させ、
- b) 前記吸着媒体（100）から前記核酸を溶出させ、
- c) 電気泳動によって反応室（17）から、そこに接続された取出し室（50）にチャネル（49）を介して前記核酸を移動させかつ前記取出し室で濃縮する、方法。

2. 前記吸着媒体（100）が前記吸着の後に洗浄されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

3. 緩衝液の変更または電気泳動によって前記核酸が前記吸着媒体（100）か

ら溶出されることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

4. 前記取出し室(50)に存在する溶出容積が、0.005mlから0.1mlの範囲であり、元の試料の容積よりも小さいことを特徴とする、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

5. 前記核酸が、前記吸着の前に溶解によって放出されることを特徴とする、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

6. 生物学的流体または懸濁液が、液化によって固体材料から調製されることを特徴とする、請求項1から5のいずれかに記載の方法。

7. 前記吸着媒体(100)が、シリカゲル、ガラス粒子、ガラス繊維のフリースまたはイオン交換材料からなることを特徴とする、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

8. 前記吸着媒体(100)が、ガラスによりコーティングされた磁性粒子からなり、前記磁性粒子に吸着した前記核酸が磁石(312)によって分離されることを特徴とする、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

9. 前記溶出の後にハイブリダイゼーションが行なわれることを特徴とする、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

10. 前記溶出の後に増幅が行なわれることを特徴とする、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

11. 前記溶出の後に化学ルミネセンス検出が行なわれることを特徴とする、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

12. 核酸を含有する生物学的流体および懸濁液から汚染のない核酸の分離を行なうための装置であって、前記核酸が積載される吸着媒体(100)を保持するための反応室(17)がチャネル(49)を介して取出し室(50)に接続され、前記核酸を、電気泳動デバイス(20a, 20b)によって前記反応室(17)から前記取出し室(50)に移動させることができかつ前記取出し室で濃縮することができることを特徴とする、装置。

13. 前記反応室(17)が、電気泳動緩衝液タンク(10)によって囲まれることを特徴とする、請求項12に記載の装置。

14. 前記反応室(17)が、イオン伝導性の態様で前記電気泳動緩衝液タンク(10)に接続されることを特徴とする、請求項13に記載の装置。

15. 前記反応室(17)が、前記電気泳動緩衝液タンク(10)に置かれることを特徴とする、請求項13または14に記載の装置。

16. 前記反応室(17)が、少なくとも1つのオリフィス(80)を介して充填および排出され得ることを特徴とする、請求項12から15のいずれかに記載の装置。

17. 核酸のための吸着媒体(100)が、前記反応室(17)に保持されることを特徴とする、請求項12から16のいずれかに記載の装置。

18. 前記イオン伝導性の接続部が、核酸を保持する少なくとも1つの浸透膜(31)によって形成されることを特徴とする、請求項12から17のいずれかに記載の装置。

19. 前記装置が熱可塑性材料から作られることを特徴とする、請求項12から18のいずれかに記載の装置。

20. 前記電気泳動デバイスが少なくとも2つの電極(20a, 20b)を有し、前記少なくとも2つの電極のうちの少なくとも1つは前記電気泳動緩衝液タンク(10)の中に突出するか、またはその構成要素であることを特徴とする、請求項12から19のいずれかに記載の装置。

21. 前記電気泳動デバイスが少なくとも2つの電極(20a, 20b)を有し、

前記少なくとも2つの電極のうちの少なくとも1つは前記取出し室(50)の中に突出するか、前記取出し室(50)を囲む容器(15)の構成要素であることを特徴とする、請求項12から19のいずれかに記載の装置。

22. 前記電極(20a, 20b)のうちの1つが前記反応室(17)内に突出するか、前記反応室(17)を囲む前記容器(15)の構成要素であることを特徴とする、請求項20または21に記載の装置。

23. 前記電極(20a, 20b)のうちの少なくとも1つが、導電性プラスチックから作られることを特徴とする、請求項20から22のいずれかに記載の装

置。

24. 前記導電性プラスチックが、グラファイト、鉄、銀または他の金属などの導電性添加物を含むことを特徴とする、請求項23に記載の装置。

25. 前記電極(20a, 20b)の抵抗が100MΩ未満であることを特徴とする、請求項20から24のいずれかに記載の装置。

26. 前記電極(20a, 20b)がコーティングを有することを特徴とする、請求項20から25のいずれかに記載の装置。

27. 前記電極(20a, 20b)の前記コーティングが複数の層(323, 324, 325)からなることを特徴とする、請求項26に記載の装置。

28. 少なくとも1つの前記層(323, 324, 325)が、好ましくは結合可能なタンパク質である生体高分子から形成されることを特徴とする、請求項27に記載の装置。

29. 前記結合可能なタンパク質が、抗体、抗原または他のリガンドーレセプター対の構成要素であることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

30. 前記生体高分子が、核酸がそれに結合し得るタイプのものであることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

31. 前記生体高分子がオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

32. 前記生体高分子がタンパク質様アミノ酸構造物(PNA構造物)であることを特徴とする、請求項28に記載の装置。

33. 前記層(323, 324, 325)のうちの1つが、化学反応性のリンカー分子からなることを特徴とする、請求項27に記載の装置。

34. 前記容器(15)の壁に2つの電極(20a, 20b)が互いに対向して設けられることを特徴とする、請求項20または21に記載の装置。

35. オンおよびオフに切換えることができる、磁界を発生するための手段(312)が、前記磁界が前記容器(15)を透過できるような態様で配置されることを特徴とする、請求項12から34のいずれかに記載の装置。

36. 好ましくは光電子増倍管(314)である検出装置が前記容器(15)の

付近に配置されることを特徴とする、請求項12から35のいずれかに記載の装置。

37. 前記容器(15)が光学窓(316)を有することを特徴とする、請求項36に記載の装置。

38. 前記装置に割当てられた前記電極(20a, 20b)が、互いに電氣的に接続されかつ電源(220)に接続されることを特徴とする、請求項12から37のいずれかに記載の複数の装置を有する溶出装置。

39. 前記装置が、96ウェルマイクロ滴定プレートの形式で幾何学的に配置されることを特徴とする、請求項38に記載の溶出装置。

40. x, y, z方向にピペッティングするアーム(190)、

サーモスタットが付けられた振とう機フレーム(170)、

周期的な加熱および冷却のための加熱/冷却媒体(329)、

電源(220)、

少なくとも2つの電極(20a, 20b)、

少なくとも1つのポンプ(120, 130)、

少なくとも1つの磁石(312)、および

少なくとも1つの光電子増倍管(314)のデバイスのうち少なくとも1つが設けられていることを特徴とする、請求項12から37のいずれかに記載の装置または請求項38または39に記載の溶出装置を有する、精製および濃縮装置。

41. 前記装置、前記溶出装置および単数または複数の前記デバイスが、請求項1から11のいずれかに記載の方法を行なうための処理コンピュータによって自動的に制御され得ることを特徴とする、請求項40に記載の精製および濃縮装置。

。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PC/DE 97/00517

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H1/08 C12Q1/68 C12N15/10 C12M1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H C12Q C12N C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 20 December 1995 see column 9 - column 10; claims; figures 4-6	1, 12
A	FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) 6 April 1979 see page 3, line 16 - line 23; claims; examples	1, 12
A	US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23 August 1994 see the whole document	1, 12
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  19 August 1997		Date of mailing of the international search report  27 -08- 1997
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer  Day, G



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 1/DE 97/00517

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 3 June 1993 cited in the application see claims -----	1,12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 97/00517

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 687502 A	20-12-95	DE 4420732 A JP 8009957 A	21-12-95 16-01-96
FR 2402716 A	06-04-79	NONE	
US 5340449 A	23-08-94	NONE	
DE 4139664 A	03-06-93	DE 59205979 D WO 9311218 A WO 9311221 A EP 0616638 A EP 0616639 A JP 7501222 T JP 7501223 T	15-05-96 10-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95 09-02-95

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 27/26	3 2 5 E